

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re patent application of:

Rieping, Mechthild

Appl. No.: to be assigned

Filed: herewith

For: **Process for the Fermentative Preparation
of L-Amino Acids Using Strains of the
Enterobacteriaceae Family**

Art Unit: to be assigned

Examiner: to be assigned

Atty. Dkt.: 7601/80921

**Submission of Priority Document
in Accordance with the Requirements of Rule 55**

Commissioner of Patents
U.S. Patent and Trademark Office
2011 South Clark Place
Customer Window, **MS Patent Application**
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03
Arlington, VA 22202

Sir:

Please accept the enclosed certified copy of priority document DE 103 03 571.0, filed January 30, 2003, for which benefit under 35 U.S.C. § 119/365 has been previously claimed in the above-captioned application. In the event priority to the enclosed foreign application has not been claimed, it is claimed hereby.

Respectfully submitted,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

By

Michael A. Sanzo

Michael A. Sanzo

Reg. No. 36,912

Attorney for Applicant

Date December 12, 2003
1801 K Street, N.W., Suite 401L
Washington, DC 20006-1201
Phone: (202) 419-7013



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 03 571.0

Anmeldetag:

30. Januar 2003

Anmelder/Inhaber:

Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

IPC:

C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Stech

Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen der offene Leserahmen (ORF) mit der Bezeichnung yjgF abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, herzustellen. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-

Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende

- 5 Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1995) zu finden.

10. Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 15 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen die für den yjgF-ORF
- 20 kodierende Nukleotidsequenz oder dessen Allele abgeschwächt wird bzw. werden.

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-
- 25 Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

- Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem
- 30 Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man

beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel oder ORF verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym bzw. Protein oder Gen bzw. ORF
5 inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Als offener Leserahmen (ORF, open reading frame) wird ein Abschnitt einer Nukleotidsequenz bezeichnet, der für ein Protein beziehungsweise Polypeptid oder Ribonukleinsäure kodiert oder kodieren kann, dem (der) nach dem Stand der
10 Technik keine Funktion zugeordnet werden kann. Nach Zuordnung einer Funktion zu dem betreffenden Abschnitt der Nukleotidsequenz wird im allgemeinen von einem Gen gesprochen.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität
15 oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

20 Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen der yjgF-ORF oder dafür
25 kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt wird bzw. werden,
- b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- 30 c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100 %) davon im Produkt verbleiben.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus
5 Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die
10 Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- 15 - Escherichia coli H4581 (EP 0 301 572)
- Escherichia coli KY10935 (Technical Research Laboratories 61(11): 1877-1882 (1997))
- Escherichia coli VNIIGenetika MG442 (US-A-4278,765)
- Escherichia coli VNIIGenetika M1 (US-A-4,321,325)
- 20 - Escherichia coli VNIIGenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- Escherichia coli BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)
- Escherichia coli kat 13 (WO 98/04715)
- Escherichia coli KCCM-10132 (WO 00/09660)

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung
25 Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))

- *Serratia marcescens* TLR156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
- *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))

- 5 L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz
- 10 gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie
- 15 beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich
- 20 Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-
- 25 Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der
- 30 Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-
- 35 Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-

Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des Yfik-
5 Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere Ausschaltung des Gens oder offenen Leserahmens (ORF) yjgF
10 in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

Die Nukleotidsequenzen der Gene oder offenen Leserahmen (ORF) von Escherichia coli gehören zum Stand der Technik und können der von Blattner et al. (Science 277: 1453 -
15 1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden.

Der yjgF-ORF wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung:	offener Leserahmen
20 Funktion:	unbekannte Funktion
Referenz:	Wasinger VC. und Humphery-Smith I.; FEMS microbiology letters 169(2): 375-82 (1998) Volz K.; Protein science 8(11): 2428-2437 25 (1999)
Accession No.:	AE000495

Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der
30 Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen offenen Leserahmen können erfindungsgemäß verwendet werden.

Weiterhin können Allele der Gene oder offene Leserahmen verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des

- 5 genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) ergeben. Die Verwendung endogener Gene bzw. offener Leserahmen wird bevorzugt.

Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen

- 10 Gene oder offene Leserahmen oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression der Gene oder offenen Leserahmen oder die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine herabgesetzt

- 15 bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch

- 20 Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem

- 25 beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15: 58-64 (1999)), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3: 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und

- 30 Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

- Mutationen, die zu einer Veränderung beziehungsweise Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und
- 5 Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5511-5515 (1998)), Wentz und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266: 20833-20839 (1991)) genannt.
- 10 Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,
- 15 Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens
- 20 einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), die dazu führen, dass falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Entsteht als Folge der Mutation ein Stop-Kodon im Kodierbereich, so führt dies
- 25 ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und
- 30 Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav
- 35 Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Geeignete Mutationen in den Genen wie beispielsweise Deletionsmutationen können durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al.

- 5 (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989))
beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines
konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere
im Stand der Technik beschriebene Methoden wie
beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of
10 Bacteriology 181: 7143-7148 (1999)) oder die von Boyd et
al. (Journal of Bacteriology 182: 842-847 (2000)) können
gleichfalls benutzt werden.

- Es ist ebenfalls möglich, Mutationen in den jeweiligen
Genen oder Mutationen, die die Expression der jeweiligen
15 Gene oder offenen Leserahmen betreffen, durch Konjugation
oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

- Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie
Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur
20 Abschwächung des yjgF-ORFs ein oder mehrere Enzyme des
bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des
anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die
Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-
Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder
25 Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu verstärken.

- Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang
die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder
mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die
durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man
30 beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene oder
offenen Leserahmen erhöht, einen starken Promotor oder ein
Gen bzw. ORF verwendet, das für ein entsprechendes Enzym
bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und
gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%,
5 maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 10 • das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 99/18228),
- 15 • das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31: 279-283 (1984)),
- 20 • die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),
- 25 • das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (WO 02/06459),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen
30 von Corynebacterium glutamicum (WO 01/92545),

- das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende *gdhA*-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- 5 • das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende *hns*-Gen (Molecular and General Genetics 212: 199-202 (1988)),
- das für die Phosphoglucomutase kodierende *pgm*-Gen (Journal of Bacteriology 176: 5847-5851 (1994)),
- das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende *fba*-Gen (Biochemical Journal 257: 529-534 (1989)),
- 10 • das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende *ptsH*-Gen des *ptsHIcrr*-Operons (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- 15 • das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende *ptsI*-Gen des *ptsHIcrr*-Operons (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- 20 • das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende *crr*-Gen des *ptsHIcrr*-Operons (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende *ptsG*-Gen (Journal of Biological Chemistry 261: 16398-16403 (1986)),
- 25 • das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende *lrp*-Gen (Journal of Biological Chemistry 266: 10768-10774 (1991)),
- das für den globalen Regulator *Csr* kodierende *csrA*-Gen (Journal of Bacteriology 175: 4744-4755 (1993)),
- 30 • das für den Regulator des *fad*-Regulons kodierende *fadR*-Gen (Nucleic Acids Research 16: 7995-8009 (1988)),

- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen (Journal of Bacteriology 172: 2642-2649 (1990)),
- 5 • das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen (Journal of Biological Chemistry 261: 12414-12419 (1986)), das auch unter der Bezeichnung groES bekannt ist,
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 10 7617-7621 (1995)),
- das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 7617-7621 (1995)),
- 15 • das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (Journal of Bacteriology 170: 3150-3157 (1988)),
- das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen (Journal of Biological Chemistry 262: 5999-6005 (1987)),
- 20 • das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cysJIH-Operons (Journal of 25 Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (Journal of Biological Chemistry 264: 30 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),

- das für den positiven Regulator PhoB des pho Regulons kodierende phoB-Gen des phoBR-Operons (Journal of Molecular Biology 190 (1): 37-44 (1986)),
- das für das Sensorprotein des pho Regulons kodierende
5 phoR-Gen des phoBR-Operons (Journal of Molecular Biology 192 (3): 549-556 (1986)),
- das für das Protein E der äusseren Zellmembran kodierende phoE-Gen (Journal of Molecular Biology 163 (4): 513-532 (1983)),
- 10 • das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat Kinase I kodierende pykF-Gen (Journal of Bacteriology 177 (19): 5719-5722 (1995)),
- das für die 6-Phosphofructokinase II kodierende pfkB-Gen (Gene 28 (3): 337-342 (1984)),
- 15 • das für das periplasmatische Bindeprotein des Maltose-Transports kodierende malE-Gen (Journal of Biological Chemistry 259 (16): 10606-10613 (1984)),
- das für die Superoxiddismutase kodierende sodA-Gen (Journal of Bacteriology 155 (3): 1078-1087 (1983)),
- 20 • das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseABC-Operons (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)),
- das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen des rseABC-Operons (Molecular
25 Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)),
- das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (European Journal of Biochemistry 141 (2): 351-359 (1984)),

- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (European Journal of Biochemistry 141 (2): 361-374 (1984)),
- 5 • das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen des suc ABCD-Operons (Biochemistry 24 (22): 6245-6252 (1985)),
- das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (Biochemistry 24
10 (22): 6245-6252 (1985)),
- das für die Adenylat-Kinase kodierende adk-Gen (Nucleic Acids Research 13(19): 7139-7151 (1985)),
- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeA-Gen (Journal of
15 Bacteriology 175(23): 7747-7748 (1993)),
- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeB-Gen (Journal of Bacteriology 175(23): 7747-7748 (1993)),
- das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende icd-Gen
20 (Journal of Biological Chemistry 262(22): 10422-10425 (1987)),
- das für das periplasmatische, Galaktose-bindende Transportprotein kodierende mglB-Gen (Molecular and General Genetics 229(3): 453-459 (1991)),
- 25 • das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende lpd-Gen (European Journal of Biochemistry 135(3): 519-527 (1983)),
- das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen (European Journal of
30 Biochemistry 133(1): 155-162 (1983)),

- das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen (European Journal of Biochemistry 133(3): 481-489 (1983)),
- 5 • das für die Aminopeptidase B kodierende pepB-Gen (Journal of Fermentation and Bioengineering 82: 392-397 (1996)),
- das für die Aldehyd-Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3) kodierende aldH-Gen (Gene 99(1): 15-23 (1991)),
- 10 • das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yodA (Accession Number AE000288 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) (Science 277(5331): 1453-1474 (1997))
- das für das Eisen-Speicher-Homoprotein (Bacterioferritin) kodierende bfr-Gen (Journal of 15 Bacteriology 171(7): 3940-3947 (1989)),
- das für die Uridin-Phosphorylase kodierende udp-Gen (Nucleic Acids Research 17(16): 6741 (1989) und
- das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355- 20 371 (1997)),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Die Verwendung endogener Gene bzw. offener Leserahmen wird im allgemeinen bevorzugt. Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der 25 Population einer Art vorhandenen Gene beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des yjgF-ORFs eines oder mehrere der Gene 30 ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
- 10 • das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
- 15 • das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (WO 02/29080),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (WO 02/36797),
- das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen (Journal of Bacteriology 170: 4528-4536 (1988)),
- 20 • das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 59: 256-261 (1995)), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist,
- 25 • das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (Molecular and General Genetics 226: 332-336 (1991)), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,
- das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung katF-Gen bekannt ist,

- das für die Aspartat Ammonium-Lyase (Aspartase) kodierende aspA-Gen (Nucleic Acids Research 13(6): 2063-2074 (1985)),
 - das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen (Nucleic
- 5 Acids Research 16(19): 9342 (1988))

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur
- 10 Abschwächung des yjgF-ORFs unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).
- 15 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch-Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch-Verfahren (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im
- 20 Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 25 Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology
- 30 (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette

wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden.

- 5 Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff

- 10 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

- 15 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können
20 essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder
25 in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure

- 30 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika
35 hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen

aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die
5 Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

- Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch
- 10 Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry
15 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Patentanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Threonin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende Schritte
5 durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen man den yjgF-ORF oder
die dafür kodierende Nukleotidsequenz abschwächt,
10 insbesondere ausschaltet,
 - b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
 - c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei
gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe
15 und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder
Anteilen (> 0 bis 100 %) davon im Produkt
verbleiben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen
20 einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen
25 einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression
30 des Polynukleotids, das für das Produkt des offenen
Leserahmens yjgF kodiert abschwächt, insbesondere
ausschaltet.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die
regulatorischen und/oder katalytischen Eigenschaften
des Polypeptids (Enzymproteins) verringert, für das das
5 Polynukleotid des offenen Leserahmens yjgF kodiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich
10 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe:
- 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin
Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die
Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
- 15 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-
Gen,
- 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende
pps-Gen,
- 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
20 kodierende ppc-Gen,
- 6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA
und pntB,
- 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
- 6.7 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende
25 mqo-Gen,
- 6.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
- 6.9 das für das Threoninexport-Protein kodierende
thrE-Gen,

- 6.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende
gdhA-Gen,
- 6.11 das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende
hns-Gen,
- 5 6.12 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen,
- 6.13 das für die Fructose Biphosphat Aldolase
kodierende fba-Gen,
- 6.14 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-
Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
- 10 6.15 das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems
kodierende ptsI-Gen,
- 6.16 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente
kodierende crr-Gen,
- 15 6.17 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente
kodierende ptsG-Gen,
- 6.18 das für den Regulator des Leucin-Regulons
kodierende lrp-Gen,
- 6.19 das für den globalen Regulator Csr kodierende
csrA-Gen,
- 20 6.20 das für den Regulator des fad-Regulons kodierende
fadR-Gen,
- 6.21 das für den Regulator des zentralen
Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,
- 6.22 das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen,
- 25 6.23 das für die kleine Untereinheit der Alkyl
Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,

- 6.24 das für die große Untereinheit der Alkyl
Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
- 6.25 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-
Gen,
- 5 6.26 das für den Regulator des cys-Regulons kodierende
cysB-Gen,
- 6.27 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-
Reduktase kodierende cysJ-Gen,
- 10 6.28 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase
kodierende cysI-Gen,
- 6.29 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende
cysH-Gen,
- 6.30 das für den positiven Regulator PhoB des pho
Regulons kodierende phoB-Gen,
- 15 6.31 das für das Sensorprotein des pho Regulons
kodierende phoR-Gen,
- 6.32 das für das Protein E der äusseren Zellmembran
kodierende phoE-Gen,
- 20 6.33 das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat
Kinase I kodierende pykF-Gen,
- 6.34 das für die 6-Phosphofructokinase II kodierende
pfkB-Gen,
- 6.35 das für das periplasmatische Bindeprotein des
Maltose-Transports kodierende malE-Gen,
- 25 6.36 das für die Superoxiddismutase kodierende sodA-
Gen,
- 6.37 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-
Aktivität kodierende rseA-Gen,

- 6.38 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen,
- 6.39 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,
- 5 6.40 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,
- 6.41 das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,
- 10 6.42 das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,
- 6.43 das für die Adenylat-Kinase kodierende adk-Gen,
- 6.44 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeA-Gen,
- 15 6.45 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeB-Gen,
- 6.46 das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende icd-Gen,
- 20 6.47 das für das periplasmatische, Galaktose-bindende Transportprotein kodierende mglB-Gen,
- 6.48 das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende lpd-Gen,
- 6.49 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,
- 25 6.50 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen,
- 6.51 das für die Aminopeptidase B kodierende pepB-Gen,

6.52 das für die Aldehyd-Dehydrogenase kodierende aldH-Gen,

6.53 das für das Genprodukt des offenen Leserahmens yodA kodierende yodA-Gen,

5 6.54 das für das Eisen-Speicher-Homoprotein kodierende bfr-Gen,

6.55 das für die Uridin-Phosphorylase kodierende udp-Gen und

10 6.56 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
15 von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe:

7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,

20 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,

7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa,

25 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,

7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,

7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,

- 7.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen,
- 7.8 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
- 5 7.9 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
- 7.10 das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen,
- 7.11 das für die Aspartat Ammonium-Lyase (Aspartase) kodierende aspA-Gen und
- 10 7.12 das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen
- abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man den yjgF-ORF oder die dafür kodierende Nukleotidsequenz abschwächt, insbesondere ausschaltet,
- 10 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolierung der L-Aminosäure.